Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R. -E. Bader

Vergleichende Untersuchungen über die indirekte Hämagglutination und die Bakterienagglutination

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ernst Robert Langlotz
aus Frankfurt am Main

1968

9561

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547601_0115

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. R. -E. Bader

Vergleichende Untersuchungen über die indirekte Hämagglutination und die Bakterienagglutination

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ernst Robert Langlotz
aus Frankfurt am Main

1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. F. Lembeck

Berichterstatter: Professor Dr. R.-E. Bader

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

Meinen Eltern

INHALT

Seite

I. Einleitung 1

1. Bakterienagglutination 1

2. Indirekte Hämagglutination 2

3. Empfindlichkeit der indirekten Hämagglutination 6

4. Spezifität der indirekten Hämagglutination 7

5. Die Aufgabe der vorliegenden Untersuchung: Prüfung der Vollständigkeit des O-Antigenkomplexes in der indirekten Hämagglutination im Vergleich mit der Bakterienagglutination 9

II. Eigene Untersuchungen 11

1. Material und Methoden 11

2. Ergebnisse 13

III. Besprechung der Ergebnisse 18

IV. Zusammenfassung 22

V. Literatur 23

I. EINLEITUNG

1. Bakterienagglutination

VON GRUBER u. DURHAM und WIDAL beschrieben 1896 unabhängig voneinander zwei serologische Reaktionen, die auf der Beobachtung beruhen, daß das Serum eines Typhuskranken die Fähigkeit besitzt, suspendierte Typhusbakterien zusammenzuklumpen. Diese Fähigkeit der "Agglutination" (VON GRUBER) richtet sich spezifisch gegen die Bakterienart, die die Erkrankung verursacht. VON GRUBER entwickelte aufgrund dieses Phänomens eine Methode zum Nachweis fraglicher Typhusbakterien mit Hilfe bekannter Typhus-Antiseren. WIDAL konnte Typhuserkrankungen umgekehrt dadurch sichern, daß er im Serum des Erkrankten Typhusbakterien-agglutinierende Substanzen nachwies.

Es zeigte sich, daß dieses Phänomen nicht auf Typhusbakterien beschränkt ist. Wenn mehrfach eine größere Anzahl von Bakterien derselben Spezies in die Blutbahn eines menschlichen oder tierischen Organismus gelangen, so lassen sich regelmäßig nach einiger Zeit in der Globulinfraktion der Serumeiweiße spezifische Antikörper nachweisen, die nur diese eine Bakterienspezies agglutinieren.

Es gibt zwei Formen der Bakterienagglutination. Die eine ist in der Regel qualitativ: ein Tropfen Serum wird auf einen Objektträger gegeben, mit einer Impfnadel werden Keime von der Kultur aufgenommen und in den Serumtropfen verrieben. Der Ausfall der Reaktion kann mit dem bloßen Auge oder unter der Lupe beurteilt werden.

Eine quantitative Bestimmung der Antikörper ist durch Verwendung einer Reagensglasreihe mit steigenden Serumverdünnungen möglich. Die höchste Verdünnungsstufe, die die zugegebene Bakteriensuspension noch agglutiniert, ist der Titer, ein Maß für die Menge der Antikörper.

Für die Entstehung der Antikörper und für die Agglutination der Bakterien sind Substanzen verantwortlich, die an der Oberfläche und im Innern der Bakterien lokalisiert sind. Durch physikalische oder chemische Behandlung können diese "Antigene" von der Bakterienzelle gelöst, isoliert und chemisch untersucht werden. Man unterscheidet somatische (O- oder Körper-) Antigene und Geißel-(H-) Antigene. Einige Bakterienspezies besitzen zusätzlich Kapselantigene, welche die Agglutination der O-Antigene hemmen können.

Die Körperantigene sind im allgemeinen hitzestabil (Ausnahmen siehe

KAUFFMANN 1936 und 1947; BADER und KLEINMAIER 1952 a und b), chemisch sind sie meist Lipopolysaccharide. Die Spezifität wird durch den Polysaccharidanteil bestimmt (KAUFFMANN, LÜDERITZ, STIERLIN und WESTPHAL 1960). Die Geißelantigene haben Eiweißcharakter und sind hitzelabil.

Durch die Loslösung von der Bakterienzelle verlieren die Antigene nicht die Fähigkeit, spezifisch mit den homologen Antikörpern zu reagieren; die Reaktion tritt nun als Präzipitation in Erscheinung. Die Präzipitate können auf ihren Gehalt an Eiweißstickstoff untersucht werden. Daraus ist eine weitere Methode der quantitativen Antikörperbestimmung entwickelt worden (KABAT und MAYER 1948).

Bei der Bakterienagglutination erscheinen die Antikörper als "Agglutinine", bei der Präzipitationsreaktion als "Präzipitine". Sehr wahrscheinlich handelt es sich jedoch um dieselben Eiweißkörper, wie durch Absättigungsversuche gezeigt werden konnte (AVERY und GOEBEL 1933).

Die GRUBER-WIDAL-Reaktion hat sich als diagnostische Methode zur Erkennung bakterieller Erkrankungen bewährt. Sie hat weiterhin die Differenzierung nahe verwandter Bakterienspezies ermöglicht, die durch mikroskopische und stoffwechselchemische Kriterien allein nicht voneinander unterschieden werden konnten. Das KAUFFMANN-WHITE-Schema, das die große Gattung der Salmonellen nach ihren Antigenfaktoren ordnet, ist ein Beweis für die Leistungsfähigkeit der Bakterienagglutination.

Bei der Klassifizierung der Salmonellen war eine zusätzliche Schwierigkeit zu überwinden: es zeigten sich ausgedehnte Kreuzreaktionen. Dieses Phänomen schien zunächst eine Einschränkung der oben beschriebenen Spezifität zu bedeuten. Es konnte jedoch durch die Tatsache erklärt werden, daß jede Spezies mehrere Antigenfaktoren besitzt, von denen einzelne einer größeren Gruppe von Spezies gemeinsam sind. Die Antikörper reagieren also nicht spezies-spezifisch, sondern antigen-spezifisch. Spezies-spezifisch ist allein die Antigenkombination. Durch einen Kunstgriff, die Herstellung von Einfaktoren-Seren durch Absorption der übrigen Faktoren mit entsprechenden Antigenen, gelang schließlich die genaue Bestimmung der Antigenkombinationen aller bisher bekannter Salmonellenarten, wie sie das KAUFFMANN-WHITE-Schema verzeichnet.

2. Indirekte Hämagglutination

KEOGH, NORTH und WARBURTON berichteten 1947 über ein bisher nicht bekanntes serologisches Phänomen. Extrakte von Glattformen von Hämophilus influenzae-Kulturen enthalten eine Substanz, die sich an Hammelerythrozyten anlagert. Diese Substanz selbst verursacht nicht die Agglutination der Erythrozy-

ten; derart behandelte Erythrozyten werden aber spezifisch agglutiniert von Seren, die von Kaninchen durch Immunisierung mit H. influenzae gewonnen worden sind.

In den folgenden Jahren erschienen eine Reihe weiterer Arbeiten, die über ähnliche Beobachtungen mit Antigenextrakten anderer Bakterienspezies berichteten.

MIDDLEBROOK und DUBOS entwickelten 1948 aufgrund dieses Phänomens eine serologische Reaktion zum Nachweis von Antikörpern gegen Mycobacterium tuberculosis im Serum Tuberkulosekranker.

NETER konnte 1956 anhand der inzwischen angewachsenen Literatur das Phänomen in größerem Zusammenhang beschreiben und von ähnlichen Erscheinungen abtrennen. Die indirekte, bedingte oder passive Hämagglutination ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Die im Bakterienextrakt gelösten Antigene lagern sich spontan an die Erythrozytenoberfläche an. Die derart modifizierten Erythrozyten werden, vermitelt durch die Bakterienantigene, von homologen Antikörpern agglutiniert. Die Erythrozyten dienen als Indikatoren: aus einer nicht sichtbaren Präzipitationsreaktion wird eine mit dem bloßen Auge sichtbare Hämagglutinationsreaktion.

Antigenextrakt. Die Antigene der verschiedensten Bakterienspezies, die an Erythrozyten angelagert werden konnten, hatten alle - bis auf zwei fragliche Ausnahmen - chemisch Lipopolysaccharidstruktur (NETER 1956). Sie bedurften aber einer vorherigen Hitze- und/oder Alkali-Behandlung, um diese Erythrozytenmodifizierende Fähigkeit zu bekommen (Ausnahmen siehe unten).

Nach NETER (1954) hat diese Behandlung zwei Wirkungen: 1. die Antigenmoleküle werden vermehrt von der Bakterienzelle gelöst; 2. die gelösten Antigene werden aktiviert, so daß sie Erythrozyten modifizieren können. Für diese Aktivierung spielen wahrscheinlich zwei verschiedene Vorgänge eine Rolle. Nach NETER und Mitarbeitern (1956) sinkt die Molekülgröße der gelösten Antigene durch die Hitze-Alkali-Behandlung auf ein Zehntel der ursprünglichen Größe. Weiterhin wird der Lipidanteil der Lipopolysaccharid-Komplexes teilweise abgespalten.

Dies hatten schon 1955 LANDY, TRAPANI und CLARK berichtet. Die Verminderung des Lipidanteils wird dadurch bedeutetungsvoll, daß, wie diese Autoren zeigten, ätherextrahierte Lipidanteile aus S. typhi (Palmitinsäure, Cholesterol u.a.) die Anlagerung von aktivierten S. typhi-Extrakten meßbar verminderten. Die Hemmwirkung der Lipidanteile für die Antigenanlagerung wird noch durch eine weitere Beobachtung unterstrichen. Die einzigen bisher bekannten Bakterienspezies, deren O-Antigenextrakte auch ohne Hitze-Alkali-Behandlung Erythrozyten modifizieren können, sind Shigella dysenteria und Serratia marces-

cens. Der Lipidanteil ihrer O-Antigene beträgt aber nur 1 - 2 % bzw. 5 %, gegenüber etwa 33 % bei S. typhi (LANDY, TRAPANI und CLARK 1955).

Da die Spezifität der O-Antigene durch die Polysaccharidkomponente bestimmt wird, bedeutet die Abspaltung von Lipiden kein Verlust an Antigenität. Wegen der bereits erwähnten Hitzestabilität der O-Antigene (Ausnahmen siehe oben), ist im allgemeinen kein Verlust an Antigenfaktoren durch die Hitzebehandlung zu befürchten.

Die für die indirekte Hämagglutination verwendeten Antigenextrakte wurden nach unterschiedlichen Methoden hergestellt. Der Rohextrakt läßt sich am einfachsten gewinnen: die abgeschwemmten Bakterienkulturen werden gekocht und die Bakterienzellen abzentrifugiert. Der Überstand mit den gelösten Antigenen dient als Antigenextrakt. (SPAUN 1952; NETER 1954; KUNIN und BEARD 1963). Demgegenüber gelang es verschiedenen Autoren, durch Phenolextraktionen (BOIVIN und MESROBEANU 1933; MIDDLEBROOK und DUBOS 1948; WESTPHAL, LÜDERITZ und BISTER 1952) oder durch Säuredialyse und mehrfache Äthanolfällungen (FULTHORPE 1954; WEBSTER, SAGIN, LANDY und JOHNSON 1955) gereinigte Lipopolysaccharide zu gewinnen, die nach Hitze-Alkali-Behandlung fähig waren, Erythrozyten zu modifizieren. Diese meist komplizierten Reinigungsprozesse dienen vornehmlich zur chemischen Analyse der somatischen Antigene.

Der Vorteil gereinigter Antigenpräparate für die indirekte Hämagglutination wurde von NETER und GORZYNSKI (1954) gering eingeschätzt. Dagegen forderte LANDY 1954 die Verwendung gereinigter Antigenextrakte, um mögliche uncharakteristische Antigenkomponenten auszuschließen. Er räumte aber ein, daß auch mit Rohextrakten brauchbare Ergebnisse zu erreichen seien.

LANDY, TRAPANI und CLARK verglichen 1955 ein von ihnen hergestelltes Reinantigen von S. typhi mit Rohextrakten und konnten keinen Unterschied hinsichtlich der Empfindlichkeit feststellen.

VOSTI und Mitarbeiter untersuchten 1964 die serologische Spezifität von Roh- und Reinantigenpräparaten aus E. coli-Kulturen. Mit beiden Antigenextrakten beobachteten sie unspezifische Kreuzreaktionen, mit Rohextrakten allerdings etwas häufiger. Die spezifischen Titer lagen aber auch bei Verwendung von Rohextrakten deutlich über den unspezifischen Titern, welche im übrigen durch vorheriges Absättigen mit unspezifischem Antigen erschöpft werden konnten.

Erythrozyten. Zur indirekten Hämagglutination eignen sich unter anderen Erythrozyten von Mensch, Hammel, Ziege, Kaninchen und Meerschweinchen. Um direkte Hämagglutinationsreaktionen auszuschließen, die durch Heteroagglutinine gegen Erythrozyten anderer Spezies bzw. durch Blutgruppenagglutinine hervorgerufen werden können, ist es notwendig, das Serum vor der Reaktion mit den zu verwendenden unbehandelten Erythrozyten abzusättigen oder solche Erythrozy-

ten zu nehmen, die von dem Serum nicht agglutiniert werden, d.h. für Humanseren Humanerythrozyten der Gruppe O rh-negativ, für tierische Seren homologe Erythrozyten.

Darüberhinaus werden jeder Reaktion zwei Kontrollen zugefügt: Serum und unbehandelte Erythrozyten; modifizierte Erythrozyten in physiologischer Kochsalzlösung. Nur wenn diese beiden Kontrollen negativ sind, kann das Ergebnis der Reaktion bewertet werden.

Das steril gewonnene Blut wird defibriniert; die ausgewaschenen Erythrozyten können in ALSEVER's Lösung (ALSEVER und AINSLIE 1941) bis zu zehn Wochen konserviert werden.

Anlagerung. Zur Anlagerung wird die Erythrozytensuspension mit dem Antigenextrakt bei 37° C angesetzt. Der genaue Mechanismus der Anlagerung ist nicht bekannt. Es handelt sich nach NETER (1956) nicht um eine einfache Adsorption.

Reaktion. Die modifizierten Erythrozyten werden einer Serumverdünnungsreihe zugegeben. Die höchste Verdünnungsstufe, die noch eine Hämagglutinationsreaktion zeigt, gibt den Agglutinintiter des Serums an. Weitere Einzelheiten über die Methodik siehe bei KIENINGER (1960).

Die indirekte Hämagglutination wird wie die Bakterienagglutination zur Bestimmung von Bakterienantigenen und von entsprechenden Antikörpern verwendet. Sie ist empfindlicher als die Bakterienagglutination. Mit ihrer Hilfe gelang die Entdeckung von Antikörpern, die mit der Bakterienagglutination nicht nachgewiesen werden konnten (NETER, ZALEWSKI und FERGUSON 1953; GAINES und LANDY 1955). Die Tatsache, daß mit der indirekten Hämagglutination nur Polysaccharid-Antigene (O- und Vi-Antigene) nachgewiesen werden können, bedeutet bisweilen einen zusätzlichen Vorteil.

Von einigen Bakterien ließen sich bisher keine O-Antigen-Extrakte gewinnen, die Erythrozyten modifizieren konnten (z.B. einzelne Streptokokken-Spezies, ROEMER und MAI 1960). Eine Erklärung für diese Erscheinung steht noch aus.

Im Folgenden seien einige Bakterienspezies genannt, von denen Antigenextrakte für die indirekte Hämagglutination gewonnen werden konnten: Salmonellen (SPAUN 1951 und 1952; STAUB 1954), E. coli (NETER u.a. 1952; KUNIN und BEARD 1963), Shigella dysenteriae (NETER und GORZYNSKI 1954), Staphylokokken (OEDING 1957), Streptokokken der Gruppe D (ROEMER und MAI 1960; MOSKOWITZ 1960), Brucellen (BRODHAGE und FREY 1955), Past. pestis (NEEL und BALTAZARD 1954), Pseudomonas (GAINES und LANDY 1955), Mycobacterium tuberculosis (MIDDLEBROOK und DUBOS 1948).

Die indirekte Hämagglutination hat auch zum Nachweis von Antikörpern gegen Viren Verwendung gefunden (Mc KENNA, ZUSCHEK und FRANKEL 1958; LEFKOWITZ u.a. 1966).

3. Empfindlichkeit der indirekten Hämagglutination

Vergleiche der indirekten Hämagglutination mit der Bakterienagglutination zeigen im allgemeinen, daß die indirekte Hämagglutination empfindlicher ist.

ALEXANDER, WRIGHT und BALDWIN (1950) untersuchten die Seren von Tularaemie-Geimpften und -Genesenen auf Antikörper gegen Past. tularensis. Die Empfindlichkeit der indirekten Hämagglutination im Vergleich zur Bakterienagglutination schwankte zwischen einem Viertel und dem 16-fachen. Aus dieser großen Schwankungsbreite schlossen die Autoren, daß die beiden Titrationsmethoden verschiedene Aktivitäten der Seren messen.

NETER, ZALEWSKI und FERGUSON (1953) untersuchten den Agglutinintiteranstieg im Serum von Versuchspersonen, denen E. coli 055, B_5 oral verabreicht worden war. Mit der indirekten Hämagglutination ließ sich bei allen 15 Versuchspersonen, denen 5330 bzw. 16000 Millionen Keime verabreicht worden waren, ein Titeranstieg nachweisen, die Bakterienagglutination dagegen zeigte nur bei 13 Versuchspersonen eine positive Reaktion. Die Titer der indirekten Hämagglutination lagen 5- bis 20mal höher als die der Bakterienagglutination.

FULTHORPE (1954) untersuchte ein gereinigtes Salmonellen-Antigen mit Hilfe der indirekten Hämagglutination. Er stellte eine weitgehende Parallelität zwischen den Titern der indirekten Hämagglutination und den entsprechenden Titern der Bakterienagglutination fest, die indirekte Hämagglutination erzielte aber höhere Titer.

LANDY, TRAPANI und CLARK berichteten 1955 über Untersuchungen mit einem gereinigten O-Antigen von S. typhi. Sie überprüften die Seren von 64 Typhus-Geimpften mit der Bakterienagglutination und der indirekten Hämagglutination und verglichen die Titer. 26 Seren gaben in beiden Reaktionen gleich hohe Titer, bei 26 weiteren Seren war die indirekte Hämagglutination doppelt, bei 12 Seren viermal so empfindlich wie die Bakterienagglutination.

GAINES und LANDY (1955) wiesen in Seren von klinisch gesunden Kindern und Erwachsenen Antikörper gegen Pseudomonas aeruginosa mit Hilfe der indirekten Hämagglutination nach. Ab dem 4. Lebensjahr zeigten fast alle Untersuchten in der indirekten Hämagglutination eine positive Reaktion. Die Bakterienagglutination war immer negativ, auch bei einem Serum, das in der indirekten Hämagglutination einen Titer von 900 hatte. Der Hämagglutinintiter konnte durch Absorption mit homologen Keimen erschöpft werden, nicht dagegen mit den Pseudomonas-Spezies fluorescens, graveolens, punctata, ovalis, carotovora oder mit Serratia marcescens, S. typhimurium, Vibrio comma und anderen. Dadurch scheint die Spezifität des Hämagglutinintiters bewiesen zu sein.

Die Autoren können das Phänomen, daß einzelne Seren in der indirekten

Hämagglutination einen hohen Titer aufweisen, obwohl sie homologe Bakterien nicht agglutinieren, nicht erklären. Sie erwägen zwei Möglichkeiten: 1. Es kann sich um inkomplette Antikörper handeln; 2. Die Dichte der Antigenfaktoren auf der Erythrozytenoberfläche könnte zu gering sein, um eine Agglutinationsreaktion zu ermöglichen, dagegen ausreichend, um die Agglutinine zu binden. Auf der Erythrozytenoberfläche lägen die Antigene möglicherweise dichter, so daß die Agglutination zustande kommt.

CHUN und PARK (1956) untersuchten die Kreuzreaktionen serologischer Typen von Sh. flexneri mit Hilfe der indirekten Hämagglutination. Diese zeigte sich der Bakterienagglutination an Empfindlichkeit und Spezifität unterlegen, sie entsprach etwa der Komplement-Bindungsreaktion.

ROEMER und MAI veröffentlichten 1960 Untersuchungen über Antikörperbildung bei Patienten mit Streptokokken-D-Infektionen. Sie verglichen die indirekte Hämagglutination mit einem Ring-Präzipitintest und stellten fest, daß sie wesentlich empfindlicher sei.

Dieser Überblick zeigt, daß die indirekte Hämagglutination mit wenigen Ausnahmen deutlich empfindlicher ist als die Bakterienagglutination.

Die großen Schwankungen der Empfindlichkeit im Verhältnis zur Bakterienagglutination könnten Zweifel an der Spezifität der indirekten Hämagglutination erwecken. Der folgende Abschnitt bringt eine Übersicht über die Literatur zu dieser Frage.

4. Spezifität der indirekten Hämagglutination

Schon MIDDLEBROOK und DUBOS, die 1948 über den Nachweis von Agglutininen bei Tuberkulosekranken mit Hilfe der indirekten Hämagglutination berichteten, untersuchten die Spezifität dieser Reaktion. Seren von Kranken mit Syphilis und Streptokokkeninfektionen wie auch von tuberkulinnegativen Testpersonen konnten Erythrozyten, die mit Antigenextrakt von Tuberkelbakterien modifiziert worden waren, nicht oder nur mit einem niedrigen Titer (1 : 8) agglutinieren.

NETER und GORZYNSKI berichteten 1954 über Untersuchungen mit Sh. dysenteriae. Erythrozyten von Hammel, Mensch, Kaninchen und Meerschweinchen, die mit Antigenextrakt aus Sh. dysenteriae modifiziert worden waren, wurden von drei homologen Seren agglutiniert; mit zwei Sh. sonnei-Antiseren, zwei Pneumokokken-Antiseren und zwei E. coli-Antiseren verlief die Reaktion negativ. Diese Befunde sprechen für die Spezifität der indirekten Hämagglutination.

LANDY, JOHNSON, WEBSTER und SAGIN veröffentlichten 1955 Untersu-

chungen, in denen sie u.a. die Spezifität des von ihnen isolierten S.typhi-Lipopolysaccharids in der indirekten Hämagglutination mit der Spezifität der Bakterienagglutination verglichen. Die Ergebnisse beider Reaktionen waren im wesentlichen gleich, d.h. die modifizierten Erythrozyten wurden nur von den Seren agglutiniert, die auch die homologen Bakterien agglutinierten. Die Autoren schließen daraus, daß das gereinigte Antigen dieselbe serologische Spezifität besitze wie der O-Antigenkomplex der Bakterien.

KUNIN und BEARD (1963) untersuchten die O-Antigene bei 131 E.coli-Typen. Die Autoren stellten zunächst Seren gegen jeden der zu untersuchenden Coli-Typen her und brachten diese Seren dann mit sämtlichen Coli-Typen in der indirekten Hämagglutination und in der Bakterienagglutination zur Reaktion. Als Antigenextrakt diente der Überstand gekochter Kulturen nach Zentrifugieren.

Es wurden zahlreiche Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Coli-Typen beobachtet, jedoch waren die Ergebnisse der indirekten Hämagglutination und der Bakterienagglutination in diesem Punkte nicht gleich. 66 Seren zeigten nur in der indirekten Hämagglutination Kreuzreaktionen, 363 Seren zeigten nur in der Bakterienagglutination Kreuzreaktionen und 59 Seren wiesen mit beiden Reaktionen Kreuzreaktionen auf. Einzelne Seren reagierten mit fast allen der untersuchten Stämme, am ausgeprägtesten tat dies das Serum gegen Typ 0 14.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Coli 0 14-Antiseren auf Agglutinine gegen verschiedene Salmonellaspezies, gegen Serratia marcescens, Sh. flexneri und Brucella abortus in der indirekten Hämagglutination und in der Bakterienagglutination geprüft. Die indirekte Hamagglutination gab in allen Fällen eine positive Reaktion, während die Bakterienagglutination immer negativ verlief.

Die Autoren schließen daraus, daß E. coli 0 14 besonders reich an einem "heterogenetischen" Antigenfaktor sei, bzw. die Bildung eines heterogenetischen Antikörpers besonders stimuliere, der fast allen Enterobacteriaceen gemeinsam sei. Das Bemerkenswerte an diesem Antigenfaktor ist, daß er nur in der indirekten Hämagglutination agglutiniert wird, obwohl er als Bestandteil des Bakteriums bei der Immunisierung die Bildung der heterogenetischen Antikörper auslöst.

Die Verfasser schließen aus ihren Versuchen, die indirekte Hämagglutination sei eine empfindliche und ziemlich spezifische Reaktion zum Nachweis von Antikörpern gegen E. coli-Antigene, unter der Voraussetzung, daß man sowohl die begrenzten Kreuzreaktionen innerhalb der O-Gruppe als auch die breiten, "heterogenetischen" Kreuzreaktionen zwischen den Enterobacteriaceen in Rechnung stelle und kontrolliere.

VOSTI, MONTO, OLDER und RANTZ untersuchten in einer 1964 veröffentlichten Arbeit die serologische Spezifität von rohen und gereinigten Antigenextrakten aus E. coli in der indirekten Hämagglutination.

Sie stellten fest, daß bei Verwendung roher Antigenextrakte häufiger Kreuzreaktionen zu beobachten waren als mit gereinigten Antigenextrakten. Die homologen Titer waren aber deutlich höher als die heterologen, die im übrigen durch Absättigung mit Antigenextrakt von E. coli O 14 vermieden werden konnten. Die Autoren bemerken zum Schluß: "Non O-specific antibody did not interfere significantly with the measurement of O-specific antibody in the sera of normal diseased patients when red cells sensitized with either pure or crude extracts were employed".

5. Die Aufgabe der vorliegenden Untersuchung: Prüfung der Vollständigkeit des O-Antigenkomplexes in der indirekten Hämagglutination im Vergleich mit der Bakterienagglutination

Die zitierten Vergleiche der indirekten Hämagglutination mit der Bakterienagglutination ergeben im allgemeinen eine größere Empfindlichkeit der indirekten Hämagglutination bei etwa gleicher Spezifität. Es fällt jedoch auf, daß das Verhältnis der Empfindlichkeit im Vergleich zur Bakterienagglutination teilweise erheblich schwankt. Es gibt sogar Seren, die in der indirekten Hämagglutination einen hohen Titer zeigen, obwohl sie homologe Bakterien nicht agglutinieren (GAINES und LANDY 1955; KUNIN und BEARD 1963).

Dies führt zu der Frage, ob die bei der indirekten Hämagglutination und bei der Bakterienagglutination zur Reaktion gelangenden O-Antigenkomplexe identisch sind, was nur durch kreuzweise Absorptionsversuche festgestellt werden kann.

Der einzige Bericht über Absättigungsversuche mit Antigen-modifizierten Erythrozyten findet sich bei STAUB (1954). Die Verfasserin untersucht die Frage, ob Lipopolysaccharidpräparate aus S. typhi 0 901 alle O-Antigenfaktoren der Bakterienzelle enthalten. Ein durch alkalische Hydrolyse gewonnener Antigenextrakt hatte die Fähigkeit, Erythrozyten zu modifizieren. Mit derart modifizierten Erythrozyten wurden Absättigungsversuche bei vier Typhus-Antiseren vom Pferd und fünf Typhus-Antiseren vom Kaninchen unternommen, die alle durch Immunisierung mit gekochten S. typhi-Keimen gewonnen worden waren.

Die Absättigungsergebnisse waren sehr unterschiedlich. Zwei Antiseren vom Pferd ließen sich durch Absorption mit modifizierten Erythrozyten völlig, zwei weitere Seren fast vollständig für die Bakterienagglutination erschöpfen. Die Bakterienagglutinin-Titer der von Kaninchen gewonnenen Seren konnten dagegen trotz regelrechter Absorption mit modifizierten Erythrozyten nicht

oder nur um ein bis zwei Verdünnungsstufen gesenkt werden. Aus diesen und weiteren Untersuchungen glaubte STAUB für ihre Frage schließen zu müssen, daß es auch O-Antigene gebe, die nicht Lipopolysaccharidcharakter haben.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit soll es sein, die Identität der bei der indirekten Hämagglutination und der Bakterienagglutination zur Reaktion gelangenden O-Antigenkomplexe durch kreuzweise Absorption zu überprüfen.

II. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material und Methoden

Stämme: Die Untersuchungen wurden mit S. paratyphi B O (Sammlungsstamm 248) und S. gallinarum (Sammlungsstamm 74) durchgeführt. Es wurden zwei O-Stämme gewählt, um thermolabile H-Antigene (Geißeln) auszuschließen. Beweglichkeitskontrollen im halbstarren Agar vor Beginn der Untersuchungen verliefen negativ. Sie bestätigten den O-Charakter der beiden Stämme.

Seren: Die Seren wurden von Kaninchen gewonnen. Vor Beginn der Injektionsbehandlung wurden die Tiere mit der indirekten Hämagglutination auf Agglutinine gegen die zu injizierenden Bakterien überprüft. In der Serumverdünnung 1 : 20 ließen sich keine Agglutinine gegen die jeweiligen Keime nachweisen.

Die Bakterien wurden zur Immunisierung durch Erhitzen (30 Min bei 56° C) abgetötet. Diese schonende thermische Behandlung wurde gewählt, um die Antigenfaktoren möglichst wenig zu alterieren.

Den Tieren wurden vier bis sechs Injektionen intravenös in steigenden Dosen (0,1 ml bis 0,5 bzw. 0,8 ml in Verdünnung 1 : 30) ein- bis zweimal wöchentlich verabfolgt.

Die modifizierten Kaninchenerythrozyten wurden zur Immunisierung wie für die indirekte Hämagglutination (siehe unten) zubereitet. Vor der Injektion wurde die Anlagerung der Antigene an die Erythrozyten durch eine indirekte Hämagglutinationsreaktion kontrolliert. Es wurden sieben Injektionen intravenös in steigenden Dosen (0,7 ml Erythrozyten in Verdünnung 1 : 5 bis 1,6 ml in Verdünnung 1 : 2) ein- bis zweimal wöchentlich verabfolgt.

Die Tiere wurden fünf bzw. sieben Tage nach der letzten Injektion entblutet, die gewonnenen Seren mit Merthiolat (Endverdünnung 1 : 10 000) konserviert.

Indirekte Hämagglutination

Antigenextrakt: Drigalskischalen wurden mit einer 8 Std zuvor beimpften Nährbouillon (1 ml Bouillon pro Schale) beschickt und 24 Std bei 37° C gehalten. Die Kulturen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt (3 ml pro Schale) und die gewonnene Suspension 1 Std bei 120° C autoklaviert. Der nach Zentrifugieren erhaltene Überstand diente als Antigen-Extrakt.

Anlagerung der Antigene an die Erythrozyten: Hammelerythrozyten wurden

dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen und in der Verdünnung 1 : 500 mit der gleichen Menge Antigenüberstand (1 : 20 verdünnt) für 30 Min bei 37° C ins Wasserbad gegeben. Die derart modifizierten Erythrozyten wurden durch dreimaliges Waschen von den gelösten Antigenen gereinigt und schließlich in der Verdünnung 1 : 1 000 in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert.

Reaktion und Auswertung: Die modifizierten Erythrozyten wurden in eine Reagensglasreihe mit steigenden Serumverdünnungen (Anfangsverdünnung 1 : 15, Verdünnungsfaktor 1 : 2) gegeben und zwar jeweils 0,5 ml der modifizierten Erythrozyten zu 0,5 ml Serumverdünnung.

Um auszuschließen, daß eine positive Reaktion durch spontane Agglutination der modifizierten Erythrozyten oder durch Erythrozytenagglutinine des Serums vorgetäuscht würde, wurden bei jeder Reaktion zwei Kontrollen zugefügt:
1. 0,5 ml modifizierte Erythrozyten und 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung;
2. 0,5 ml Serum 1 : 25 verdünnt und 0,5 ml unbehandelte Erythrozyten (Verdünnung 1 : 1 000).
Serumverdünnungsreihe und Kontrollen wurden für 30 Min im Wasserbad von 37° C gehalten. Die Reaktion wurde nach kurzem Zentrifugieren abgelesen. Bildete sich nach kurzem Schütteln ein körniges oder scholliges Agglutinat, so war die Reaktion positiv, bildete sich eine homogene Erythrozytensuspension, so war sie negativ. Bei positivem Ausfall einer Kontrolle wurde die Reaktion nicht bewertet.

Direkte Bakterienagglutination: Es wurden drei Serumverdünnungsreihen (Anfangsverdünnung 1 : 25) hergestellt und zu je einer Verdünnungsreihe eine der drei folgenden Bakteriensuspensionen gegeben: 1. lebende Bakterien; 2. durch halbstündiges Erhitzen auf 56° C abgetötete Bakterien; 3. Bakterien, die 1 Std bei 120° C autoklaviert worden waren. Es wurden jeweils 0,5 ml der bis zu schwacher Opaleszens verdünnten Bakteriensuspension zu 0,5 ml Serumverdünnung gegeben.

Um spontane Agglutination der Bakterien als solche zu erkennen, wurden in einem Kontrollglas 0,5 ml der Bakteriensuspension zu 0,5 ml physiologischer Kochsalzlösung gegeben.

Die Ablesung der Reaktion erfolgte nach etwa 12stündigem Aufenthalt im Wasserbad von 37 bzw. 52° C. Zeigten sich nach leichtem Beklopfen der Reagensglaskuppe körnige Agglutinate, so wurde die Reaktion als positiv gewertet, bildeten sich homogene, schlierenförmige Schleier, so wurde die Reaktion als negativ gewertet. Bei positivem Ausfall der Kontrollen wurde die Reaktion nicht bewertet.

Absättigung der Seren:
Mit abgetöteten Bakterien (56° C, 30 Min): Eine von 10 Drigalskischalen

(S. paratyphi B O) bzw. 20 Drigalskischalen (S. gallinarum, schwächeres Wachstum) gewonnene Bakteriensuspension wurde durch halbstündiges Erhitzen auf 56° C abgetötet und 1 Std. bei 3000 U/Min zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 7,5 ml Serum (1 : 25 verdünnt) versetzt und die Mischung für etwa 4 Std bei 37° C gehalten. Nach einstündigem Zentrifugieren (3000 U/Min) wurde das überstehende, nunmehr abgesättigte Serum abpipettiert.

Mit autoklavierten Bakterien (120° C, 1 Std): Die wie oben gewonnene Bakteriensuspension wurde 1 Std bei 3000 U/Min zentrifugiert, das gewonnene Sediment 1 Std bei 120° C autoklaviert und dann wie oben zur Absättigung verwendet.

Mit modifizierten Erythrozyten: 75 ml gewaschenes Erythrozytensediment vom Hammel wurde mit 75 ml unverdünntem Antigenüberstand versetzt und die Mischung für 30 Min bei 37° C gehalten.

Die nun modifizierten Erythrozyten wurden dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung ausgewaschen, um gelöste Antigene zu entfernen.

Das ausgewaschene, durch einstündiges Zentrifugieren gewonnene Antigen-Erythrozyten-Sediment wurde in 7,5 ml Serum (1 : 25 verdünnt) suspendiert und für 4 Std bei 37° C im Wasserbad gehalten. Nach einstündigem Zentrifugieren wurde das überstehende, nun abgesättigte Serum abpipettiert.

2. Ergebnisse

S. paratyphi B O (I, IV, V, XII), Sammlungsstamm 248

Tabelle 1 zeigt die Absättigungsergebnisse mit Serum 248 (56° C).

Vor der Absättigung (Spalte 1) hatte dieses Serum in der Bakterienagglutination und in der indirekten Hämagglutination hohe Titer. Der Titer gegen autoklavierte Bakterien (800) lag eine Verdünnungsstufe unter den Titern gegen lebendes und gegen thermisch (56° C) abgetötetes Antigen (1600), während der Titer in der indirekten Hämagglutination um eine Verdünnungsstufe höher lag (3200).

Die negative Reaktion in der indirekten Hämagglutination nach Absättigung des Serums mit modifizierten Erythrozyten (Spalte 2) beweist, daß die Absättigung regelrecht erfolgt war. Es blieben Agglutinine gegen lebendes, gegen thermisch (56° C) abgetötetes und gegen autoklaviertes Antigen. Die Titer lagen aber zwei Verdünnungsstufen niedriger als vor der Absättigung.

Spalte 3 gibt die Agglutinationstiter nach Absättigung des Serum 248 (56° C) mit autoklavierten Bakterien wieder. Die Absättigungskontrolle - Agglutination der autoklavierten Bakterien - war negativ. Das abgesättigte Serum aggluti-

nierte nur lebende Bakterien. Der Titer lag drei Verdünnungsstufen niedriger als vor der Absättigung (200).

zur Agglutination verwendetes Antigen	Agglutinationstiter von Serum 248 (56° C) unabgesättigt	abgesättigt mit AG 248, 120°C, angelagert an Erythrozyten	abgesättigt mit AG 248, 120° C
AG 248 lbd	1600	640	200
AG 248 56°C	1600	400	Ø
AG 248 120°C	800	200	Ø
AG 248 120°C, angelagert an Erythrozyten	3200	Ø	-

Tabelle 1: Absättigungsergebnisse mit Serum 248 (56° C)
(Ø = negativ bei Serumverdünnung 1 : 50; - = nicht untersucht)

Das mit autoklaviertem Antigen abgesättigte Serum 248 (56° C) wurde nicht in der indirekten Hämagglutination überprüft. Dies erschien nicht erforderlich, da die modifizierten Erythrozyten aufgrund der Antigenbereitung nicht mehr O-Antigenfaktoren besitzen als autoklavierte Bakterien.

Tabelle 2 gibt die Absättigungsergebnisse mit Serum 248 (AG-Erythr.) wieder, das durch Injektionen modifizierter Erythrozyten gewonnen worden war. Vor der Absättigung hatte dieses Serum nur einen Titer in der indirekten Hämagglutination (1600), Bakterien wurden nicht agglutiniert.

Durch Absättigung mit thermisch abgetötetem (56° C) Antigen konnte der Titer für die indirekte Hämagglutination erschöpft werden.

Zur Agglutination verwendetes Antigen	Agglutinationstiter von Serum 248 (AG-Erythr.)	
	unabgesättigt	abgesättigt mit AG 248 56° C
AG 248 lbd	Ø	Ø
AG 248 56°C	Ø	Ø
AG 248 120°C	Ø	Ø
AG 248 120°C, angelagert an Erythrozyten	1600	Ø

Tabelle 2: Absättigungsergebnisse mit Serum 248 (AG-Erythr.)
(Ø = negativ bei Serumverdünnung 1 : 50)

S. gallinarum (I, IX, XII), Sammlungsstamm 74

Die Absättigungsergebnisse mit Serum 74 (56° C) gibt Tabelle 3 wieder.

Vor der Absättigung (Spalte 1) agglutinierte das Serum lebendes und thermisch abgetötetes (56° C) Antigen, sowie modifizierte Erythrozyten mit gleichem Titer (12 800), während der Titer gegen autoklavierte Bakterien um eine Verdünnungsstufe niedriger lag (6 400).

Spalte 2 zeigt die Resttiter nach Absättigung mit modifizierten Erythrozyten. Wie die negative Reaktion in der indirekten Hämagglutination beweist, war die Absättigung regelrecht. Es blieben hohe Titer gegen lebendes, gegen thermisch abgetötetes (56° C) und gegen autoklaviertes Antigen (3200 bzw. 1600).

Aus Spalte 3 sind die Agglutinationstiter nach Absättigung mit autoklavierten Bakterien zu ersehen. Die Absättigungskontrolle - Agglutination des autoklavierten Antigens - war negativ. Es blieben Resttiter gegen lebendes und gegen thermisch abgetötetes (56° C) Antigen, die aber fünf Verdünnungsstufen unter den Anfangstitern lagen (400).

zur Agglutination verwendetes Antigen	Agglutinationstiter von Serum 74 (56° C) unabgesättigt	abgesättigt mit AG 74, 120°C, angelagert an Erythrozyten	abgesättigt mit AG 74, 120° C
AG 74 lbd	12800	3200	400
AG 74 56°C	12800	3200	400
AG 74 120°C	6400	1600	Ø
AG 74 120° C, angelagert an Erythrozyten	12800	Ø	Ø

Tabelle 3: Absättigungsergebnisse mit Serum 74 (56° C)
(Ø = negativ bei Serumverdünnung 1 : 50)

Tabelle 4 bringt die Absättigungsergebnisse mit Serum 74 (AG-Erythr.), das durch Injektionen modifizierter Erythrozyten gewonnen worden war.

zur Agglutination verwendetes Antigen	Agglutinationstiter von Serum 74 (AG-Erythr.) unabgesättigt	abgesättigt mit AG 74 56° C
AG 74 lbd	200	Ø
AG 74 56°C	200	Ø
AG 74 120°C	100	Ø
AG 74 120°C, angelagert an Erythrozyten	3200	Ø

Tabelle 4: Absättigungsergebnisse mit Serum 74 (AG-Erythr.)
(Ø = negativ bei Serumverdünnung 1 : 50)

Vor der Absättigung (Spalte 1) hatte dieses Serum einen hohen Titer in der indirekten Hämagglutination (3200) und geringe, um vier Stufen niedrigere Titer gegen lebende und gegen thermisch abgetötete (56° C) Bakterien (200). Der Titer gegen autoklavierte Bakterien lag um eine weitere Verdünnungsstufe niedriger (100).

Nach der Absättigung mit thermisch abgetötetem (56° C) Antigen waren sämtliche Titer dieses Serums erschöpft.

III. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

S. paratyphi B O

Nach Absättigung mit modifizierten Erythrozyten agglutinierte Serum 248 (56° C) noch lebendes, thermisch (56° C) abgetötetes und autoklaviertes Antigen. Die modifizierten Erythrozyten hatten die Bakterienagglutinine des Serums 248 (56° C) trotz regelrechter Absättigung nicht erschöpfen können.

Daraus muß geschlossen werden, daß der O-Antigenkomplex modifizierter Erythrozyten gegenüber dem O-Antigenkomplex von Bakterien unvollständig ist. Bei der Bereitung des Antigen-Erythrozytenkomplexes gehen O-Antigenfaktoren verloren.

Die physikalischen Eigenschaften dieser verlorengegangenen O-Antigene lassen sich anhand der Absättigungsergebnisse wie folgt bestimmen.

Nach Absättigung mit modifizierten Erythrozyten agglutinierte Serum 248 (56° C) unter anderem auch autoklaviertes, d.h. hitzestabiles Antigen. Das bedeutet, daß der Resttiter - zumindest teilweise - durch hitzestabile O-Antigene bedingt ist.

Um festzustellen, ob auch hitzelabile O-Antigene mit an dem Resttiter beteiligt sind, wurde Serum 248 (56° C) mit autoklaviertem Antigen absorbiert. Es blieb ein Titer gegen lebendes Antigen.

Da dieser Resttiter durch autoklaviertes, d.h. hitzestabiles Antigen nicht erschöpft werden konnte,und nur gegen lebendes Antigen gerichtet war, muß er einem hitzelabilen Faktor entsprechen.

Der hitzelabile Faktor ist aber auch an dem Resttiter nach Absättigung mit dem Antigen-Erythrozytenkomplex beteiligt, da dieser aufgrund seiner Zubereitung nur hitzestabile O-Antigenfaktoren enthält.

Der Resttiter nach Absättigung mit modifizierten Erythrozyten ist folglich durch hitzelabile und hitzestabile O-Antigenfaktoren bedingt. Das bedeutet, daß bei der Bereitung des Antigen-Erythrozytenkomplexes hitzelabile und hitzestabile O-Antigene verloren gehen.

Das Serum 248 (AG-Erythr.), das durch Injektion modifizierter Erythrozyten gewonnen worden war, zeigte in der indirekten Hämagglutination einen hohen Titer, der durch Absättigung mit thermisch (56° C) abgetöteten Bakterien erschöpft werden konnte.

Daraus kann geschlossen werden, daß nach Immunisierung mit modifizierten Erythrozyten nicht mehr O-Agglutinine gebildet werden, als von Bakterien

absorbiert werden können. Sämtliche in der indirekten Hämagglutination beteiligten Antigene sind folglich bakterielle O-Antigene, die auch in der Bakterienagglutination reagieren.

S. gallinarum

Das Serum 74 (56° C) hatte nach regelrechter Absättigung mit modifizierten Erythrozyten noch hohe Titer gegen lebende, gegen thermisch (56° C) abgetötete und gegen autoklavierte Bakterien. Letzteres zeigt, daß die modifizierten Erythrozyten nicht alle gegen thermostabile Antigene gerichteten Agglutinine erschöpfen konnten. Daraus folgt, daß die modifizierten Erythrozyten selbst nicht sämtliche hitzestabile O-Antigene des Bakterium besitzen.

Nach regelrechter Absättigung mit autoklaviertem Antigen agglutinierte Serum 74 (56° C) noch Bakterien. Da die Resttiter durch autoklaviertes, d.h. hitzestabiles Antigen nicht erschöpft werden konnten und nur lebendes und thermisch (56° C) abgetötetes Antigen agglutinierten, müssen sie einem hitzelabilen Antigen entsprechen.

Dieses hitzelabile Antigen wird bei der Bereitung des Antigen-Erythrozytenkomplexes (Autoklavieren) zerstört, daher ist es mit für den Resttiter nach Absättigung von Serum 74 (56° C) mit modifizierten Erythrozyten verantwortlich.

Die Restagglutinine nach Absättigung mit modifizierten Erythrozyten entsprechen hitzelabilen und hitzestabilen Antigenen. Die Unvollständigkeit des O-Antigenkomplexes modifizierter Erythrozyten ist folglich durch den Verlust hitzelabiler und hitzestabiler Antigene bedingt.

Serum 74 (AG-Erythr.) hatte im Unterschied zu Serum 248 (AG-Erythr.) in der Bakterienagglutination deutliche Titer, die allerdings erheblich unter dem Titer in der indirekten Hämagglutination lagen.

Nach Absättigung mit thermisch (56° C) abgetöteten Bakterien zeigte Serum 74 (AG-Erythr.) in der Hämagglutination keinen Titer mehr. Das bedeutet, daß nach Immunisierung mit modifizierten Erythrozyten gebildete Agglutinine durch Bakterien erschöpft werden. Daraus folgt, daß der Antigen-Erythrozytenkomplex nicht mehr O-Antigenfaktoren enthält als das Bakterium.

Aus den berichteten Absättigungsversuchen geht - übereinstimmend bei beiden Salmonellenspezies - hervor, daß der O-Antigenkomplex modifizierter Erythrozyten unvollkommen ist. Dafür sind nicht nur hitzelabile O-Antigene, wie sie bei beiden Spezies beobachtet werden konnten, sondern auch hitzestabile O-Antigene verantwortlich.

Bei der Bereitung des Antigen-Erythrozytenkomplexes gehen also bestimmte Antigenfaktoren verloren. Theoretisch kann dieser Verlust bei einem der vier folgenden Vorgänge eintreten: 1. durch das Autoklavieren werden Antigenfak-

toren zerstört; 2. nicht alle O-Antigenfaktoren des Bakterium gehen beim Autoklavieren in Lösung; 3. nicht alle gelösten Antigenfaktoren werden von der Erythrozytenoberfläche adsorbiert; 4. durch die Adsorption an die Erythrozyten verlieren einzelne Antigenfaktoren ihre agglutininbindenden und agglutinablen Eigenschaften.

Die hitzelabilen Antigene werden durch den ersten Vorgang zerstört. Bei welchem Vorgang die hitzestabilen Antigenfaktoren verloren gehen, ist unbekannt.

Die bei der Herstellung des Antigen-Erythrozyten-Komplexes in Verlust geratenen Antigene können in der indirekten Hämagglutination - zumindest in der hier ausgeführten Form - nicht nachgewiesen werden.

Die Seren, die durch Injektion modifizierter Erythrozyten gewonnen worden waren, zeigten in der indirekten Hämagglutination hohe Titer, während sie Bakterien nicht oder mit einem wesentlich niedrigerem Titer agglutinierten.

Durch Absättigung mit Bakterien wurde der Hämagglutinationstiter vollständig erschöpft. Die höheren Titer, die diese Seren in der indirekten Hämagglutination erzielen, sind daher nicht durch zusätzliche Antigen-Antikörper-Systeme bedingt, sondern durch die größere Empfindlichkeit der indirekten Hämagglutination.

Die Empfindlichkeit der indirekten Hämagglutination übertrifft die der Bakterienagglutination normalerweise nur um das zwei- bis vierfache, in den vorliegenden zwei Fällen jedoch um das mehr als zehnfache. Diese großen Schwankungen im Empfindlichkeitsgrad der indirekten Hämagglutination könnten unter Umständen durch folgende Überlegungen erklärt werden. Seren, die durch Injektion modifizierter Erythrozyten hergestellt worden sind, enthalten - da deren Antigenkomplex unvollständig ist - weniger Agglutinine als die üblichen Seren, die durch Immunisierung mit abgetöteten Bakterien gewonnen worden sind. Im ersten Fall sind die reagierenden Antigen-Antikörper-Systeme in der indirekten Hämagglutination und in der Bakterienagglutination identisch, im zweiten Fall sind in der Bakterienagglutination mehr Antigen-Antikörper-Systeme als in der indirekten Hämagglutination beteiligt. Aus diesem Grund sind die Bakterienagglutinationstiter im ersten Fall relativ niedriger als im zweiten.

Der Unterschied der Empfindlichkeit zwischen der indirekten Hämagglutination und der Bakterienagglutination wird erst dann sichtbar, wenn in beiden Agglutinationsmethoden die gleichen Antigen-Antikörper-Systeme zur Reaktion gelangen. Dies ist nur bei Seren der Fall, die durch Injektion modifizierter Erythrozyten hergestellt worden sind. Die in den üblichen, durch Injektion abgetöteter Bakterien hergestellten Seren enthaltenen zusätzlichen Bakterienagglutinine lassen die wesentlich höhere Empfindlichkeit der indirekten Hämagglutination nicht so deutlich in Erscheinung treten.

Diese Überlegungen könnten auch für die anderen Fälle gelten, in denen die

Empfindlichkeit der indirekten Hämagglutination die der Bakterienagglutination um das zehnfache und mehr übertrifft. Bei sämtlichen, weiter oben erwähnten Beispielen handelt es sich nämlich nicht um übliche, durch Bakterienagglutination gewonnene Immunseren, sondern um Seren von Kranken und Genesenen (ALEXANDER, WRIGHT und BALDWIN 1950; NETER, ZALEWSKI und FERGUSON 1952; GAINES und LANDY 1955). Möglicherweise könnte in diesen Fällen eine in-vivo-Modifizierung der strömenden Erythrozyten im Verlauf der bakteriellen Infektion, wie sie SKILLMANN und Mitarbeiter 1955 bei rheumatischem Fieber beobachteten, für die Bildung der Serumantikörper eine Rolle spielen.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Durch kreuzweise Absorptionsversuche wurden die O-Antigenkomplexe modifizierter Erythrozyten und homologer Bakterien verglichen und auf ihre Identität untersucht.

1. Der O-Antigenkomplex modifizierter Erythrozyten, die mit Hilfe eines autoklavierten Antigenextraktes gewonnen worden waren, war unvollkommen. Die in Verlust geratenen O-Antigene waren teils thermolabil, teils thermostabil.
2. Die wesentlich höhere Empfindlichkeit der indirekten Hämagglutination konnte bestätigt werden. Die beträchtlichen Schwankungen der Empfindlichkeit beim Vergleich verschiedener Seren lassen sich vielleicht durch die Unvollständigkeit des O-Antigenkomplexes modifizierter Erythrozyten bzw. durch den unterschiedlichen Agglutiningehalt der Seren erklären.

V. LITERATUR

ALEXANDER, M.M., WRIGHT, G.G. and BALDWIN, H.C.: Observations on the agglutination of polysaccharide-treated erythrocytes by tularemia antisera.
J. exp. Med. 91, 561 (1950)

ALSEVER, J.B. and AINSLIE, R.B.: A new method for the preparation of dilute blood plasma and the operation of complete transfusion service.
N.Y.St. J. Med. 41, 126 (1941)

AVERY, O.T., and GOEBEL, W.F.: Chemoimmunical studies on the soluble specific substance of pneumococcus.
I. The isolation and properties of the acetyl polysaccharide of pneumococcus Type I.
J. exp. Med. 58, 731 (1933)

BADER, R.-E. und KLEINMAIER, H.: Über ein neuartiges thermolabiles Körperantigen bei gramnegativen Darmbakterien.
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 133, 434 (1952)

BADER, R.-E. und KLEINMAIER, H.: Über den Nachweis eines thermolabilen Antigens bei Ruhr-Bakterien (Shigella flexneri Typ 6).
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 135, 27 (1952)

BOIVIN, A. et MESROBEANU, L. in C.R.Soc.Biol. 112, 76 (1933), zit. nach STAUB, A.M. et COMBES, R.: Essais de dosage des antigènes somatiques au sein de S.typhi.
Ann. Inst. Pasteur 80, 21 (1951)

BRODHAGE, H. und FREY, H.: Beobachtungen bei der Hämagglutinationsreaktion auf Bang und Tuberkulose mit menschlichen und tierischen Sera.
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 141, 76 (1955)

CHUN, D. and PARK, B.: Demonstration of Shigella Flexneri antigens by means of hemagglutination test.
J. infect. Dis. 98, 82 (1956)

DAQUET, G.L.: Treponema pallidum immune-adherence and hemagglutination.
Brit. J. vener. Dis. 32, 96 (1956)

FULTHORPE, A.J.: Agglutination of sheep erythrocytes sensitized with Salmonella polysaccharides.
J. Path. Bact. 68, 315 (1954)

GAINES, S. and LANDY, M.: Prevalence of antibody to pseudomonas in normal human sera.
J. Bact. 69, 628 (1955)

GRUBER, M.v. und DURHAM: Eine neue Methode zur raschen Erkennung des Choleravibrios und des Typhusbazillus.
Münch. med. Wschr. März 1896

KABAT, E.A. and MAYER, M.M.: Experimental Immunochemistry.
C.C. Thomas, Springfield, Ill., (1948)

KAUFFMANN, F.: Untersuchungen über die Körperantigene in der Salmonella-gruppe.
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 117, 778 (1936)

KAUFFMANN, F.: On the Serology of the Salmonella V antigen.
Acta path. microbiol. scand. 24, 588 (1947)

KAUFFMANN, F., LÜDERITZ, O., STIERLIN, H. und WESTPHAL, O.: Zur Immunochemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae. I. Analyse der Zuckerbausteine von Salmonella-O-Antigenen.
Zbl. Bact. I, Orig. 178, 442 (1960)

KEOGH, E.V., NORTH, E.A. and WARBURTON, M.F.: Hemagglutinins of the Haemophilus group.
Nature 160, 63 (1947)

KIENINGER, G.: Untersuchungen zur Methodik der indirekten Hämagglutination.
Inaug.-Diss. Tübingen (1964)

KUNIN, C.M. and BEARD, M.V.: Serological studies of O-Antigen of Escherichia coli by means of the hemagglutination test.
J. Bact. 85, 541 (1963)

LANDY, M.: On hemagglutination procedures utilizing isolated polysaccharides and protein antigens.
Amer. J. publ. Hlth. 44, 2, 1059 (1954)

LANDY, M., JOHNSON, A.G., WEBSTER, M.E. and SAGIN, J.F.: Studies on the O-Antigen of Salmonella typhosa.
II. Immunological properties of the purified antigen.
J. Immunol. 74, 466 (1955)

LANDY, M., TRAPANI, R.-J. and CLARK, W.R.: Studies on the O-antigen of Salmonella typhosa.
III. Activity of the isolated antigen in the hemagglutination procedure.
Am. J. Hyg. 62, 54 (1955)

LEFKOWITZ, S.S., WILLIAMS, J.A., HOWARD, B.E. and SIGEL, M.M.: Adenovirus antibody measured by the passive hemagglutination test.
J. Bact. 91, 205 (1966)

MC KENNA, J.M., ZUSCHEK, F. and FRANKEL, J.W.: A hemagglutination test for titration of antibodies to polioviruses.
Proc. Soc. exp. Biol. 97, 166 (1958)

MC NEILL, D. and MEYER, K.F.: Pasteurella pestis antibody patterns in sera of plague-convalescent and vaccinated persons determined by immuno-electrophoresis and passive hemagglutination.
J. Immunol. 74, 778 (1965)

MIDDLEBROOK, G. and DUBOS, R.J.: Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli.
J. exp. Med. 88, 521 (1948)

MOSKOWITZ, M.: Separation and properties of a red cell sensitizing substance from Streptococci.
J. Bact. 91, 2200 (1966)

NEEL, R. et BALTAZARD, M.: Mise au point d'une réaction d'hemagglutination protéinique pour la peste.
Ann. Inst. Pasteur 86, 18 (1954)

NETER, E., BERTRAM, L.F., ZAK, D.A., MURDOCK, M.R. and ARBESMAN, C.E.: Studies on hemagglutination and hemolysis by Escherichia coli antisera.
J. exp. Med. 96, 1 (1952)

NETER, E., ZALEWSKI, N.J. and FERGUSON, W.: Escherichia coli hemagglutination response of adult volunteers to ingested E. coli O 55 B_5.
Proc. Soc. exp. Biol. 82, 215 (1953)

NETER, E., GORZYNSKI, E.A., ZALEWSKI, N.J., RACHMAN, R. and GINO, M.: Studies on bacterial hemagglutination.
Amer. J. publ. Hlth. 44, 49 (1954)

NETER, E. and GORZYNSKI, E.A.: Erythrocyte-modifying capacity of Shigella dysenteriae (Shiga) antigen and its polysaccharide component.
Proc. Soc. exp. Biol. 85, 503 (1954)

NETER, E., WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., GORZYNSKI, E.A.; and EICHENBERGER, E.: Studies of enterobacterial lipopolysaccharides. Effect of heat and chemicals on erythrocyte-modifying, antigenic, toxic, and pyrogenic properties.
J. Immunol. 76, 377 (1956)

NETER, E.: Bacterial hemagglutination and hemolysis.
Bact. Rev. 20, 166 (1956)

OEDING, P.: Observations on the sensitization of erythrocytes with streptococcal polysaccharide products.
Acta.path. microbiol. scand. 41, 435 (1957)

ROEMER, G.B. und MAI, K.Z.: Antikörpernachweis bei Enterokokken-Infektionen des Menschen durch indirekte Hämagglutination.
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 147, 109 (1960)

SKILLMANN, R.K., SPURRIER, W., FRIEDMAN, I.A. and SCHWARTZ, S.O.: Rheumatic fever activity determination by two correlative methodes.
Arch. Intern. Med. 96, 51 (1955)

SPAUN, J.: On the determination of the Vi-antibodies by hemagglutination.
Acta path. microbiol. scand. 29, 416 (1951)

SPAUN, J.: Determination of Salmonella typhi O and Vi antibodies by hemagglutination.
Acta path. microbiol. scand. 31, 426 (1952)

STAUB, A.M.: Rôle des anticorps antipolyosidiques dans l'agglutination des bacilles typhiques.
Ann. Inst. Pasteur 86, 618 (1954)

VOSTI, K.L., MONTO, A.S., OLDER, J.J. and RANTZ, C.A.: The serologic specifity of crude and purified antigenextracts of Escherichia coli in hemagglutination reactions with rabbit and human antisera.
J. Immunol. 93, 199 (1964)

WEBSTER, M.E., SAGIN, J.F., LANDY, M. and JOHNSON, A.G.: Studies on the O-antigen of Salmonella typhosa. I. Purification of the antigen.
J. Immunol. 74, 455 (1955)

WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O., und BISTER, F.: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenolwasser.
Z. Naturforsch. 76, 148 (1952)

WIDAL, F.: Sérodiagnostic de la fièvre typhoide.
Presse méd. (27. juin 1896)

Herr Professor Dr. R. -E. Bader überließ mir freundlicherweise das Dissertationsthema und stellte mir einen Arbeitsplatz in seinem Institut zur Verfügung. Den Fortgang der Arbeit förderte er in allen Stadien durch seinen erfahrenen Rat. Für all dies sei ihm an dieser Stelle aufrichtig gedankt.

Lebenslauf

Ich, Ernst Robert Langlotz, wurde am 28. März 1941 als Sohn des Universitätsprofessors Ernst Langlotz und seiner Ehefrau Friederike, geborene Pummerer, in Frankfurt am Main geboren.

Volksschule und Gymnasium besuchte ich in Bonn. Nach dem Abitur (Ostern 1960) studierte ich zunächst drei Semester Geschichte an den Universitäten Bonn und München. Im Wintersemester 1961/62 begann ich an der Universität Bonn mit dem Studium der Medizin. Nach Bestehen der ärztlichen Vorprüfung (Sommer 1964) setzte ich das klinische Studium an der Universität Tübingen fort. Hier legte ich am 14. Februar 1968 das medizinische Staatsexamen ab.